PARIS

UNIVERSITE RENE DESCARTES

FACULTE DE MEDECINE DE NECKER - ENFANTS MALADES

Année 1972

N° 152

THESE

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

SPIRA Alfred Victor

né le 17 juin 1945 à Aureilhan (Htes-Pyrénées)

Présentée et soutenue publiquement le : 1972

ETUDE CHEZ L'ANIMAL DE NOUVELLES THERAPEUTIQUES ANTICANCEREUSES A VISEE IMMUNITAIRE.

Président : M. Pierre DENOIX, Professeur

Travail de l'Institut Gustave-Roussy - Villejuif.

UNIVERSITE RENE DESCARTES

FACULTE DE MEDECINE DE NECKER - ENFANTS MALADES

Année 1972 N°

T H E S E

pour le

D O C T O R A T E N M E D E C I N E

(Diplôme d'Etat)

par

SPIRA Alfred Victor

né le 17 juin 1945 à Aureilhan (Htes-Pyrénées)

Présentée et soutenue publiquement le : 19

E T U D E C H E Z L ' A N I M A L D E N O U V E L L E S T H E R A P E U T I Q U E S A N T I C A N C E R E U S E S A V I S E E I M M U N I T A I R E .

Président : M. Pierre DENOIX, Professeur

Travail de l'Institut Gustave-Roussy - Villejuif.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A Monsieur le Professeur Pierre DENOIX

qui m'a fait l'honneur d'accepter
de présider cette thèse,
je tiens à exprimer ma profonde
reconnaissance.

A Madame le Docteur F. LACOUR

qui m'a acceuilli dans son laboratoire
et m'a guidé dans ce travail,
je tiens à exprimer ma plus vive
gratitude.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552727_0010

A Monsieur le Professeur D. SCHWARTZ

A Monsieur le Professeur Agrégé R. FLAMANT

en remerciement de la formation
qu'ils m'ont apportée.

A Monsieur le Docteur J. LACOUR

A Monsieur le Docteur M. PRADE

en remerciement de leur fructueuse collaboration.

A Madame C. CHIANALE

Au Personnel de l'Animalerie du Laboratoire
d'Immunologie de l'Institut Gustave Roussy

A Mesdames J. CHABANIER et M. MALLET

pour leur précieuse collaboration
technique.

- P L A N -

I - INTRODUCTION.

II - ASPECTS IMMUNOLOGIQUES DES RELATIONS HOTE-TUMEUR

A. Preuves d'une immunité anticancéreuse chez l'animal.

1°) Démonstration de l'existence de TSTA dans les tumeurs animales.

2°) Etude de l'antigénicité tumorale et de la réaction qu'elle induit.

a) Techniques d'étude des TSTA

b) Etude de la réaction immunitaire humorale et cellulaire.

B. Preuves d'une immunité anticancéreuse chez l'homme.

1°) Cancer et troubles immunitaires.

2°) Greffes tumorales chez l'homme.

3°) Preuves histologiques.

4°) Etude de l'immunité humorale et cellulaire de malades porteurs de cancers.

5°) Régression spontanée et régression sous traitement.

III - POSSIBILITES POUR UNE IMMUNOTHERAPIE ANTICANCEREUSE.

1°) Immunothérapie préventive.

2°) Immunothérapie des tumeurs établies

a) Adoptive

b) Active non spécifique.

IV - EXPERIMENTATION ANIMALE

A. But

B. Matériel

C. Méthodologie. Critères de jugement

D. Résultats

α) Chez la souris

β) Chez le hamster

1°) Action du TEIB

2°) Actions comparées du TEIB et de la chirurgie

3°) Action des polyribonucléotides synthétiques, en tant qu'adjuvants de la chirurgie

a) le poly A : poly U

b) le poly I : poly C

4°) Action conjointe du TEIB et du poly A : poly U

a) Sur la survie

b) Sur la date d'apparition des adénopathies

E. Discussion

1°) De l'action du TEIB

2°) De l'action du poly A : poly U.

V - CONCLUSION.

ETUDE CHEZ L'ANIMAL DE NOUVELLES THERAPEUTIQUES ANTICANCEREUSES A VISEE IMMUNITAIRE.

I - INTRODUCTION

De très nombreux travaux ont permis de mieux connaître les relations hôte - tumeur lors de la maladie cancéreuse, aussi bien chez l'animal que chez l'homme.

On peut à l'heure actuelle différencier :

- d'une part l'antigénicité tumorale spécifique,
- d'autre part les éléments, humoraux et cellulaires, de la réponse de l'hôte aux antigènes tumoraux spécifiques.

Nous procèderons à une rapide revue des travaux actuels relatifs à ce sujet, qui permettent d'envisager deux modalités pour l'immunothérapie active des cancers :

1°) Une immunothérapie non spécifique : la seule envisageable dans un avenir proche, basée essentiellement sur une favorisation des défenses générales de l'organisme, lui permettant de répondre de manière adéquate à la stimulation antigénique dont il est l'objet. C'est essentiellement à l'étude de cette immunothérapie non spécifique que nous nous attacherons.

2°) Une immunothérapie spécifique, véritable tentative de "vaccination" anticancéreuse.

Sur ces bases, nous décrirons des expériences personnelles, menées sur des tumeurs animales et qui montreront comment une immunothérapie non spécifique peut être un adjuvant intéressant à des thérapeutiques mieux connues, telle la chirurgie.

Ces expériences poseront également le problème du choix de la meilleure stratégie en expérimentation animale, ceci en fonction des nombreuses contraintes d'ordre matériel imposées à l'expérimentateur.

II - ASPECTS IMMUNOLOGIQUES DES RELATIONS HOTE - TUMEUR

L'étude immunitaire de la maladie cancéreuse est entreprise depuis le début du XXe siècle. A de grands espoirs initiaux suivit une phase de pessimisme qui ne prit fin que lorsqu'il apparut que l'étude du cancer chez l'animal ne pouvait être faite qu'à partir de tumeurs transplantées à des animaux génétiquement identiques ("syngeneic"). C'est seulement alors que l'on pourrait montrer l'existence d'antigènes spécifiques tumoraux et étudier des moyens immunologiques permettant de modifier la croissance tumorale. La première expérience de ce type fut menée par GROSS (1941, 1943), (PREHN).

A. Preuves d'une immunité anticancéreuse chez l'animal.

En pratique, toutes les tumeurs animales étudiées comportent des antigènes tumoraux spécifiques de transplantation (TSTA) que l'on désigne ainsi car ils furent d'abord découverts par des techniques de transplantation : des animaux immunisés sont résistants de manière spécifique à la greffe de cellules tumorales syngénéiques. La réaction immunitaire vis-à-vis des antigènes spécifiques est similaire à la réaction de rejet de greffe, et se fait par l'intermédiaire de cellules immunologiquement compétentes, à savoir lymphocytes et macrophages. Le rôle des anticorps humoraux cytotoxiques est moins certain.

1°) Démonstration de l'existence d'antigènes tumoraux spécifiques de transplantation (TSTA) dans les tumeurs animales (PREHN et MAIN, 1957)

Les TSTA sont des macromolécules présentes dans les cellules tumorales et absentes des cellules normales, et vis-à-vis desquelles on peut montrer l'existence de réactions immunitaires par des techniques de transplantation.

Il est possible, dans les lignées pures, de montrer la présence d'antigènes tumoraux spécifiques et d'immuniser un animal contre une tumeur. Les 3 principales méthodes d'immunisation sont :

1. La transplantation d'une tumeur, suivie au bout d'un certain temps de son ablation chirurgicale,

2. L'injection de cellules tumorales irradiées,

3. L'injection d'une dose de cellules tumorales trop faible pour produire une tumeur.

Ceci est particulièrement vrai dans le cas des tumeurs induites par un carcinogène chimique ou par un virus oncogène. Chez les animaux traités par l'une des trois méthodes précédentes, l'injection d'une certaine dose de cellules tumorales n'est pas suivie par l'apparition d'un cancer, alors qu'une tumeur se développe toujours chez les animaux témoins non immunisés.

Il est donc certain à l'heure actuelle que l'acquisition d'une antigénicité spécifique accompagne la transformation néoplasique :

- Toutes les tumeurs induites par un virus oncogène possèdent des autigènes tumoraux spécifiques du virus et il existe donc des réactions croisées entre les différentes tumeurs induites par un même virus. (SJOGREN, 1961 ; HABEL, 1961).

- En ce qui concerne les tumeurs induites par les carcinogènes chimiques, la situation est exactement inverse et les antigènes tumoraux sont spécifiques de la tumeur et non du carcinogène (SJOGREN, 1965).

- Enfin pour les tumeurs animales de survenue spontanée, seule une présence peu importante d'antigènes tumoraux spécifiques a été démontrée jusqu'à maintenant. (MORTON et al., 1965 ; ATTIA et al., 1965).

2°) Etude de l'antigénicité tumorale et de la réaction qu'elle induit

a) Différentes techniques permettent l'étude "in vitro" des antigènes tumoraux spécifiques, en particulier les méthodes d'immunofluorescence, la réaction de fixation du complément, la cytotoxicité en présence de complément et l'inhibition des colonies par les lymphocytes (ou par les macrophages). (Cette dernière technique a été particulièrement utilisée par HELLSTROM I et K.E. et collaborateurs, comme nous le verrons ultérieurement).

Il est possible de distinguer 2 classes parmi les antigènes tumoraux spécifiques ; les antigènes membranaires et les antigènes cytoplasmiques :

- Les antigènes membranaires (ou de surface) jouent apparemment le rôle principal dans l'immunité de transplantation où la réponse requiert la participation active des lymphocytes (et / ou des macrophages).

- Les antigènes cytoplasmiques, détectables par les techniques de fixation du complément et d'immunofluorescence, ne semblent pas contribuer pour une grande part à la reconnaissance des antigènes tumoraux spécifiques. (KLEIN et al., 1966)

b) Les mécanismes effecteurs dans la réaction immunologique contre la tumeur semblent triples :

α - Les anticorps humoraux, qui peuvent être cytotoxiques vis-à-vis de la tumeur, en particulier chez des animaux porteurs de leucémies.

β - L'infiltration de la tumeur par des lymphocytes cytotoxiques.

On peut induire la régression d'une tumeur chimio-induite, par l'injection à l'animal porteur de la tumeur, de lymphocytes produits par un autre animal immunisé par l'administration d'une petite quantité de cellules tumorales. On peut montrer que ces lymphocytes sont cytotoxiques pour la tumeur aussi bien "in vitro" qu' "in vivo". En outre, ces résultats sont identiques même quand les animaux proviennent d'espèces

différentes. ALEXANDER et al. (1966, 1967) ont montré qu'un extrait comprenant de l'ARN des lymphocytes immuns, a le même effet que l'injection des lymphocytes intacts.

Le rôle de la rate semble aussi être important dans la réaction d'hypersensibilité retardée vis-à-vis de la tumeur.

On a montré que les cellules spléniques prélevées chez un rat porteur de sarcome, sont capables d'inhiber la prise de greffe des cellules tumorales chez un receveur génétiquement identique, et ceci sous certaines conditions : elles sont cytotoxiques uniquement si la splénectomie a lieu 3 semaines après l'ablation chirurgicale de la tumeur. Lorsque la splénectomie survient dans le même temps que l'exérèse tumorale, les cellules spléniques n'ont pas d'effet remarquable sur la croissance de la tumeur transplantée.

L'effet des lymphocytes "immuns" sur les cellules tumorales semble double :

- d'une part attachement spécifique du lymphocyte à la cible cellulaire,
- d'autre part destruction de la cible.

C'est sur ces bases que repose la technique d'inhibition des colonies in vitro : après l'exérèse d'une tumeur, on peut cultiver "in vitro", dans certaines conditions, les cellules néoplasiques. On constate

alors normalement une multiplication cellulaire.

La croissance des colonies peut être inhibée par l'adjonction au milieu de lymphocytes de l'animal porteur de la tumeur. Cependant cette technique appelle immédiatement une question : pourquoi les tumeurs peuvent-elles proliférer "in vivo" alors qu'elles induisent une réponse immunitaire de type cellulaire qui est capable d'inhiber la croissance tumorale "in vitro" ?

On peut d'emblée apporter 2 tentatives de réponse à cette question :

1) Il est possible que l'immunité cellulaire détectée in vitro ne soit pas suffisamment efficace pour agir sur la tumeur in vivo, soit que les cellules immunologiquement compétentes sont insuffisamment nombreuses, soit que le nombre de ces cellules qui atteignent la tumeur est trop faible.

2) On peut invoquer l'existence d'un facteur sérique qui inhibe l'action des cellules immunologiquement compétentes, en recouvrant les antigènes de surface des cellules tumorales, qui ne sont alors plus reconnus par les lymphocytes immuns.

Bien entendu, d'autres mécanismes peuvent être invoqués, mais on possède des arguments expérimentaux montrant l'existence d'un tel facteur sérique :

HELLSTROM I. et K.E. ont étudié, sur des sarcomes induits par le virus de MOLONEY chez des souris Balb/C, l'épreuve d'inhibition des colonies. Chez les souris adultes auxquelles le virus a été inoculé, des tumeurs se sont développées et ont spontanément régressé ("régresseurs"), alors que les souris qui avaient reçu la même dose à l'âge de 21 jours ou moins sont mortes de tumeurs qui se sont développées progressivement ("progresseurs"). Le sérum des progresseurs a bloqué l'effet d'inhibition des colonies des cellules lymphoïdes des régresseurs. Le sérum de souris ayant reçu le virus à l'âge adulte a eu un effet de blocage identique tant que les souris ont porté des tumeurs se développant progressivement, mais n'a pas bloqué l'effet d'inhibition des colonies lorsque le prélèvement a eu lieu au début de la régression ou après la fin du processus. Lorsque des sérums de "régresseurs" ont été mêlés à des sérums de "progresseurs", l'effet de blocage de ces derniers a été diminué.

δ - Parallèlement à l'action des lymphocytes, les macrophages semblent jouer un rôle important dans la réaction de l'hôte vis-à-vis de la tumeur. EVANS et ALEXANDER ont montré leur rôle prépondérant dans le rejet d'ascites leucémiques chez la souris. Les macrophages agissent en tuant les cellules cibles par un contact direct, cellule à cellule. Pour agir dans ce sens, les macrophages doivent être liés à des anticorps cytophiles. On peut obtenir de tels macrophages cytotoxiques, soit à partir d'animaux sensibilisés, soit par le contact de macrophages normaux avec des cellules spléniques d'animaux sensibilisés.

B. Preuves d'une immunité anticancéreuse chez l'homme.

Deux conditions d'étude font complètement différer l'homme de l'animal :

- il n'existe pas chez l'homme de lignée génétiquement pure,
- pour des raisons d'éthique évidente, l'expérimentation est interdite.

Cependant, il existe de nombreuses preuves permettant de penser que chez l'homme, comme chez l'animal, il doit exister une réaction immunologique de l'hôte contre sa tumeur.

1°) Cancer et troubles immunitaires.

Il est maintenant certain que la fréquence des lymphosarcomes est plus grande chez les malades atteints d'hypogammaglobulinémies. Il existe en outre sûrement une corrélation entre maladies auto-immues et cancer. BURNET a insisté, à de nombreuses reprises, sur la nécessité d'un système immunologique intact pour l'élimination de cellules malignes attaquant l'organisme.

De nombreux travaux tendent à étudier l'état immunologique des malades porteurs de cancers. Les résultats de ces études sont extrêmement variables, et ce fait tient essentiellement à ce qu'il n'existait pas, jusqu'à une date récente, de test valable permettant d'explorer l'état du système immunologique chez l'homme.

A l'heure actuelle, la technique d'inhibition de la migration des leucocytes in vitro semble fournir un meilleur reflet de l'état immunologique des patients, mais son application à la recherche clinique est trop récente pour fournir des résultats nets.

LEVIN et coll. (1968), en étudiant un test de transfert lymphocytaire, ne mettent pas en évidence d'immunodépression chez les sujets porteurs de cancers, HUGHES et coll. (1965) l'observent en étudiant la réponse à la tuberculine, et il en est de même pour SOUTHAN et de nombreux autres auteurs. Quoi qu'il en soit, la question n'est toujours pas tranchée de savoir si l'immunodépression précède l'apparition du cancer ou s'il s'agit seulement d'un épiphénomène de la maladie cancéreuse. Un seul fait paraît certain, l'immunodépression est plus fréquente et plus importante chez les sujets atteints de cancers à évolution rapide et très débilitants.

2°) Greffes tumorales chez l'homme.

a) Homogreffes.

La transplantation sous-cutanée à l'homme de cellules tumorales humaines est toujours suivie de rejet (SOUTHAM et al., 1957). Le rejet peut cependant se manifester plus tardivement, voire pas du tout, chez le cancéreux (LEVIN, 1964) (SOUTHAM, 1964).

On a même pu utiliser l'homogreffe de tissu néoplasique à des sujets sains à des fins thérapeutiques (SCANBON et all., 1965), mais cette attitude est éthiquement injustifiable.

b) Autogreffes.

On peut constater la "prise" de la greffe sous-cutanée de cellules malignes au malade lui-même dans certaines conditions. Il faut, d'une manière générale, d'autant moins de cellules que le malade est plus immuno-déprimé.

3°) Preuves histologiques.

On peut relier le pronostic d'une tumeur maligne à certains caractères histologiques, en particulier au degré de l'infiltration lymphoïde.

4°) Etude de l'immunité cellulaire et humorale de malades porteurs de cancers.

a) Immunité humorale.

De nombreux travaux ont été menés à propos du lymphome de Burkitt. En effet, les études épidémiologiques permettaient de penser qu'un agent infectieux, transmis par un moustique, était à l'origine de cette tumeur. EPSTEIN et coll. (1964, 1967) ont décrit la présence

d'un virus "herpès-like" dans de nombreuses cultures dérivant du lymphome de Burkitt (connu sous le nom de EB virus). KLEIN et coll. (1966), ont montré l'existence d'anticorps circulants, dirigés contre ce virus dans le sang de malades atteints du lymphome de Burkitt.

LEWIS et coll. (1969) se sont attachés à la recherche d'anticorps spécifiques anti-tumoraux chez les malades atteints de mélanome malin en Uganda.

Après le recueil des pièces de biopsie et des sérums des malades, la présence d'anticorps antitumoraux a été étudiée par :

- la cytotoxicité en présence de complément de cellules mélaniques autologues en culture,
- l'inhibition, en présence de complément, de la synthèse d'ARN,
- l'immunofluorescence
  - . cytoplasmique des cellules tuées,
  - . et membranaire des cellules vivantes.

Plus du tiers des sérums étudiés possédaient des anticorps dirigés contre les cellules tumorales autologues.

Lorsqu'il a été possible de pratiquer l'ensemble des 3 tests chez un même malade, on a noté l'existence d'une complète concordance.

Plus de 80 % des malades porteurs d'un mélanome non disséminé ont présenté des réactions sériques positives, et chez un nombre limité de patients dont l'évolution a pu être suivie, les anticorps sériques ont disparu lors de la dissémination cancéreuse.

Par cette méthode, 2 types d'anticorps ont été reconnus :

- les uns réagissant avec les (ou le) antigènes membranaires, spécifiques pour chaque tumeur (c'est-à-dire réagissant seulement avec la tumeur autologue) et qui sont intéressés dans l'activité cytotoxique.

- les autres réagissant avec les antigènes cytoplasmiques et qui semblent être présents dans la quasi totalité des sérums de sujets atteints de mélanome malin.

G. PARIGOT et F. et J. LACOUR ont recherché des anticorps antitumoraux par la méthode d'hémagglutination passive dans le sérum des malades atteints de cancer du sein et un malade atteint d'épithélioma rénal. Dans le cas de cancer du rein et dans 25 % des cancers mammaires, la réaction a montré l'existence d'anticorps réagissant avec des antigènes hydrosolubles de la tumeur.

b) Immunité cellulaire.

HELLSTROM I. et K.E. ont recherché, toujours par la technique d'inhibition des colonies, la présence d'antigènes tumoraux spécifiques dans certains néoplasmes humains. Ils les ont tout d'abord mis en

évidence dans le neuroblastome, qui est cependant une tumeur particulière car elle régresse parfois spontanément. Au cours de ce travail les auteurs ont étudié l'inhibition des colonies, d'une part par le sérum en présence de complément, et d'autre part par les lymphocytes. Ils ont entre autres montré l'existence d'une immunité cellulaire spécifique pour les cancers du colon, la tumeur de Wilm et le mélanome malin. L'étude de l'immunité sérique a révélé une immunité spécifique et croisée dans de nombreux cas de cancers du colon.

5°) Régression spontanée et régression sous traitement.

De nombreux cas de régression tumorale spontanée sont rapportés dans la littérature, mais ils doivent être accueillis avec la plus grande circonspection.

Cependant de tels cas existent sûrement, et permettent seulement de supputer l'existence de phénomènes immunologiques dans leur génèse.

Il en est de même des cas où le traitement administré a été, ou inadéquat, ou remarquablement insuffisant. Burkitt rapporte la régression de la tumeur qu'il a décrite chez des malades n'ayant reçu qu'une injection de méthotrexate, de cyclophosphamide ou de vincristine, dose sûrement insuffisante pour avoir, à elle seule, détruit l'ensemble des cellules tumorales.

6°) Développement de tumeurs malignes chez des patients recevant un traitement immunosuppresseur.

Plusieurs observations ont été rapportées, d'apparition d'un lymphome malin primitif chez des sujets soumis à un traitement immunosuppresseur ou réputé tel, dans le but de prévenir le rejet d'une greffe rénale. Dans les observations publiées il ne semble pas s'agir d'une transmission tumorale d'homme à homme, mais bien de l'induction d'un lymphome primaire à la suite de l'administration de drogues immunosuppressives. DEODHAR (1969) rapporte le cas du développement d'un sarcome à cellules réticulaires au point d'injection d'une globuline antilymphocytaire chez un transplanté rénal, qui recevait conjointement de l'azathioprine et de la prednisone.

On peut, à propos de ces observations, suspecter que, dans certaines conditions, un agent immunosuppresseur puisse induire des lymphomes chez l'homme. On ne possède à l'heure actuelle que peu de renseignements sur l'apparition d'autres tumeurs que des lymphomes.

MC KHANN (1969) a recensé l'apparition de tumeurs malignes chez 2.000 transplantés rénaux ayant tous reçu un traitement immunodépresseur. Cette étude a permis de constater que la fréquence des sarcomes à cellules réticulaires est de 5 p. 1000 chez les transplantés rénaux, alors qu'elle est de 8,2 p. 100 000 dans la population générale de même âge. Les résultats concernant les autres types de tumeurs sont moins probants.

III - POSSIBILITES POUR UNE IMMUNOTHERAPIE ANTICANCEREUSE

C'est sur ces bases que l'on peut envisager différentes possibilités pour l'immunothérapie.

La démonstration expérimentale de l'existence d'antigènes tumoraux spécifiques permet de fonder quelques espoirs dans l'immunothérapie des tumeurs malignes, bien que des phénomènes tels que la facilitation immunologique puissent compliquer des essais de prévention et de cure de tumeurs par des moyens immunologiques.

Peu de travaux ont été réalisés pour établir des modèles d'immunothérapie chez l'animal, et les résultats obtenus dans les tumeurs humaines ne sont pas toujours convaincants.

1°) Immunothérapie préventive

Il a été relativement plus facile de prévenir que de guérir des tumeurs animales par des moyens immunologiques, et ceci car la stimulation immunologique nécessaire à la destruction d'un petit nombre de cellules disséminées est moindre que celle nécessaire à la destruction d'une masse tumorale croissante.

GOLDNER et coll. (1964), ont montré que l'on pouvait prévenir la tumorogénèse par le virus SV40 chez le hamster, par l'inoculation répétée de ce virus à faible dose durant 3 mois ou par l'injection de cellules de tumeurs induites par le virus SV40 et irradiées à forte dose.

Plus récemment, CAME et MOORE (1971) ont pu prévenir l'apparition d'une tumeur mammaire spontanée chez la souris par des injections de poly I : poly C.

2°) Immunothérapie des tumeurs établies

Les tentatives d'immunothérapie des tumeurs établies ont été moins couronnées de succès.

L'immunothérapie, pour avoir quelque chance de succès, ne doit être pratiquée qu'après l'élimination de la plus grande partie de la population de cellules tumorales. On a pu montrer, chez les souris leucémiques, que l'immunothérapie n'avait d'effet que lorsque le nombre de cellules leucémiques était inférieur à 1000.

a) Immunothérapie adoptive.

- WOODRUFF et NOHAN (1963), ont montré une régression partielle de tumeurs transplantées de la souris, sous l'effet de l'administration de cellules spléniques provenant de donneurs non immunisés.

- Les allogreffes de cellules tumorales, réalisées dans le but d'immuniser des sujets dont les leucocytes seront injectés au donneur n'ont pas fourni de résultats concluants.

- MATHE et coll. ont traité des malades leucémiques par irradiation totale à des doses léthales, suivie de greffe de moelle osseuse de donneurs sains. Ce traitement fut suivi d'un retard dans l'évolution de la maladie, mais pas de guérison.

- HADDOW et ALEXANDER (1964), ont tenté de traiter un sarcome chimio-induit du rat par l'ablation d'une partie de la tumeur qui était irradiée et dont les cellules étaient par la suite réinoculées à l'animal. Ils ont ainsi pu obtenir un retard dans l'évolution des tumeurs. Le même effet fut obtenu par l'injection de cellules lymphoïdes d'animaux sains sensibilisés contre la tumeur.

b) Immunothérapie active non spécifique.

A l'heure actuelle se développent des tentatives d'immunothérapie active non spécifique. On pense qu'un accroissement du nombre des cellules immunologiquement compétentes "in vivo" peut avoir une efficacité thérapeutique, du moins dans certains systèmes tumoraux. Un tel accroissement peut être obtenu par une stimulation non spécifique. On a jusqu'à présent surtout utilisé dans ce but les inoculations de BCG. AMIEL (1970) a montré l'effet du BCG dans la cure des leucémies de la souris, et MATHE et coll. (1970), ont montré, au cours d'un essai thérapeutique contrôlé chez l'homme, que l'administration de BCG pouvait prolonger la durée des rémissions de leucémies aigues obtenues par la chimiothérapie.

C'est dans le cadre de cette immunothérapie active non spécifique que se situe également l'action des acides polyribonucléotidiques de synthèse, que nous envisagerons dans la suite de ce travail.

IV - EXPERIMENTATION ANIMALE

A. But

Les données expérimentales et le développement de la recherch clinique montrent que l'essai de nouveaux traitements, chez l'homme, doit être précédé d'une phase d'expérimentation chez l'animal, menée selon une méthodologie comparable à celle des essais chez le malade.

Malgré toutes les difficultés soulevées par la transposition à la clinique humaine de résultats observés expérimentalement, cette phase doit permettre :

- de pratiquer un screening de nouvelles substances, en éliminant rapidement celles qui se révèlent inefficaces chez l'animal,

- d'étudier de nouveaux schémas thérapeutiques, que, pour des raisons d'éthique, il est interdit d'étudier d'emblée chez l'homme,

- éventuellement de soulever certaines hypothèses relatives aux mécanismes d'action de substances révélées actives chez l'animal, permettant de les utiliser dans des conditions optimales chez l'homme.

B. Matériel

1) Deux modèles tumoraux ont été étudiés :

a) Une tumeur mammaire spontanée de la souris : la tumeur est celle observée dans la souche C3H /He A Gif, provenant de l'éle-

vage conventionnel monogramme de l'Institut Gustave Roussy. C'est une tumeur spontanée, se rapprochant plus, de ce fait, des tumeurs humaines que les cancers greffés. On en connaît parfaitement la fréquence (94 % chez les femelles), les constantes biologiques et l'évolution.

b) Un mélanome malin transplantable du hamster doré entretenu dans l'animalerie du laboratoire d'immunologie de l'Institut Gustave Roussy à Villejuif -(Mélanome 1196). La tumeur est transplantée par greffe sous-cutanée. De manière à se rapprocher le plus possible du mélanome humain, les cellules tumorales ont été injectées par voie intra-dermique. Des quantités croissantes de cellules (comptées après coloration vitale par le bleu trypan) ont été injectées, jusqu'à détermination d'une dose léthale 100 % et provoquant l'apparition de métastases ganglionnaires dans près de 100 % des cas.

Avec une telle dose, estimée à 100 000 cellules tumorales, les néoformations apparaissent en 2 semaines environ, au point d'injection. Les tumeurs grossissent progressivement de volume jusqu'à atteindre 30 à 35 mm de diamètre, puis se nécrosent en leur centre et deviennent le siège d'une ulcération.

Les métastases ganglionnaires sont palpables environ 3 semaines à partir de la découverte de la tumeur, et elles deviennent rapidement très volumineuses, atteignant les aires ganglionnaires axillaires et inguinales droites et gauches, l'injection tumorale ayant été faite dans

la région dorsale médiane. On peut déterminer la date exacte d'apparition des adénopathies en sacrifiant des animaux tous les jours à partir de la découverte de la tumeur. La pratique systématique d'un évidement ganglionnaire axillaire et inguinal bilatéral et l'examen histologique des pièces, permettent de déterminer que des métastases microscopiques apparaissent entre le 7ème et le 10ème jour de l'évolution tumorale. Lors de l'évolution de la tumeur, d'autres métastases peuvent apparaître, les plus fréquentes étant les métastases pulmonaires, puis péritonéales.

Histologiquement, le mélanome 1196 se présente comme une prolifération tumorale constituée de cellules de tailles inégales globuleuses ou polygonales par pression réciproque, à cytoplasmes acidophiles. Elles possèdent un noyau, tantôt arrondi, nucléolé, tantôt, au contraire, à noyaux encochés, bourgeonnants. Certains éléments cellulaires par leur taille volumineuse ne sont pas sans rappeler des myocytes. La présence de mélanine est inconstante, mais une Dopa-réaction objective la nature mélano-formatrice de ces cellules.

Ces différents éléments cellulaires se groupent pour réaliser des formations tumorales grossièrement nodulaires, non encapsulées dont le centre est fréquemment remanié par de la nécrose. La mise en évidence de la réticuline montre, le plus fréquemment, un engainement monocellulaire. Le stroma conjonctif est, dans l'ensemble, grêle. Sur un plan topographique, ces formations tumorales occupent le derme, respectant le plus souvent l'épiderme, mais infiltrant en profondeur le plan musculaire. Tous ces caractères sont ceux d'un mélanome malin achromique.

2) Dans un but thérapeutique nous avons utilisé :

a) la chirurgie, consistant en une exérèse de la tumeur lorsque celle-ci mesurait environ 3 à 5 mm de diamètre. Outre la tumeur, l'exérèse intéressait une collerette de 1cm environ de peau saine autour de la tumeur. Cette exérèse a été pratiquée sous anesthésie de l'animal par l'éther, et de manière aseptique.

b) des complexes de polynucléotides, l'acide polyadénylique-polyuridylique (poly AU) et l'acide polyinosinique - polycytidilique (poly IC). Il s'agit là d'acides ribonucléotidiques synthétiques à double chaîne, obtenus par l'assemblage de chaînes monocaténaires de poly A, poly U d'une part, poly I et poly C d'autre part, provenant des Mibes laboratoires (Elkhart, Indiana, USA). Une purification supplémentaire est pratiquée de la manière suivante : les composés sont dissous séparément dans du tampon TRIS HCL 0, 1 M, contenant de l'EDTA 2.10^{-3} M, puis traités 3 fois au phénol, précipités par l'éthanol à 66 % en présence de 1% d'acétate de sodium et redissous dans Na Cl 0,14 M. Les concentrations finales sont déterminées par spectrophotométrie, les 2 composés mélangés dans des proportions équimoléculaires (par rapport aux nucléotides) et la formation des complexes bicaténaires vérifiée en traçant des courbes d'effet hyperchrome en fonction de la température.

L'utilisation en tant que substance antitumorale à visée immunitaire d'un acide ribonucléotidique synthétique est justifiée par ses propriétés :

a. C'est un inducteur de la synthèse de l'interféron, comme l'ont montré de nombreuses études. Après l'attachement de l'ARN synthétique à la surface cellulaire survient, in vitro, une phase de résistance cellulaire à l'infection virale et de production d'interféron. SARMA (1969), a montré que des souris, ayant reçu dès la naissance des injections de poly IC, ont développé de hauts titres d'interféron.

b. Il stimule la synthèse des anticorps (SCHMIDTKE et JOHNSON, 1971).

c. Il favorise l'apparition de cellules immunologiquement compétentes et de macrophages.

d. Enfin, il est antigénique par lui-même dans certaines conditions (LACOUR, MICHELSON et NAHON).

Les poly AU et le poly IC ont été administrés selon des schémas variables selon les différentes expériences qui seront décrites. La voie d'administration a toujours été intra-veineuse chez la souris, intra-péritonéale chez le hamster, voie parentérale la plus abordable chez cet animal. La posologie a été fixée à 1800 µg pour des animaux pesant en moyenne 80 gr. Les conditions d'administration ont été variables : débutant immédiatement après la chirurgie ou à la même date chez les animaux ne recevant pas de chirurgie, 2 calendriers ont été adoptés : soit 3 injections, à 2 jours d'intervalle, de 400 µg chacune, suivies, 2 semaines plus tard, de 3 injections à 2 jours d'intervalle, de 200 µg chacune, soit, débutant immédiatement après l'acte chirurgical, une série d'une injection de 200 µg tous les 2 jours jusqu'à atteindre 1800 µg/animal.

C. Méthodologie des essais

La méthodologie a été, autant que faire se peut, aussi proche que possible de la méthodologie des essais thérapeutiques contrôlés chez l'homme.

Après le choix du schéma expérimental, la constitution des groupes a été faite par tirage au sort à l'aide de tables de permutation au hasard. Les opérations ont été menées de manière "aveugle" chaque fois que cela était possible, les animaux portant un numéro, et leur traitement étant inconnu de l'expérimentateur. Les lectures histologiques ont toujours été pratiquées de manière aveugle. L'analyse des résultats a été menée en utilisant les tests statistiques usuels, le plus souvent l'analyse de variance. Lorsque la taille des échantillons était insuffisante (< 30) et que le critère étudié ne suivait pas une loi normale, des tests non paramétriques ont été utilisés, en particulier le test de Mann et Whitey. D'autre part, chaque fois que cela était nécessaire, nous avons tenu compte de facteurs de variabilité connus, par l'organisation et l'analyse des expériences selon des schémas en blocs complets et / ou blocs incomplets équilibrés.

Critères de jugement -

Chaque fois que l'on a voulu comparer globalement l'efficacité de plusieurs thérapeutiques, le temps de survie de l'animal à partir de l'injection tumorale a été retenu comme critère. L'étude du volume tumoral, qui pouvait a priori représenter un meilleur critère de jugement n'a

pas été retenu pour diverses raisons :

- il est tout d'abord très difficilement mesurable, car comme on l'a vu, la tumeur se nécrose très rapidement et est remplacée par une vaste ulcération. La mesure du volume des métastases est, elle aussi, très difficile et entachée d'une erreur non négligeable.

- retenir le volume tumoral comme critère suppose lui attribuer une signification pronostique qui n'est pas évidente, en tout cas chez l'animal. Le temps de survie nous a donc paru être un critère global intéressant nous permettant de savoir rapidement si les thérapeutiques que nous expérimentions présentaient un intérêt ou non.

Cependant, pour comparer l'efficacité et le mode d'action de ces thérapeutiques, d'autres critères ont été retenus :

- le poids des métastases ganglionnaires et leur date d'apparition.

- le poids de la rate des animaux. Ce dernier critère paraît en effet refléter l'état immunologique des animaux. Cependant la distribution du poids de la rate rapportée au poids de l'animal suit une loi log. normale, et c'est donc au logarithme de ce rapport que nous nous sommes intéressés.

D. RESULTATS

- Chez la souris :

Les souris ont été suivies à partir de l'âge de 3 mois, l'apparition des tumeurs étant dépistée par une palpation hebdomadaire des 12 glandes mammaires que possède cet animal. Les souris porteuses de tumeurs de 5 mm environ ont été réparties par tirage au sort parmi les 4 groupes suivants :

- témoins sans traitement,
- traitement par poly A : poly U seul,
- chirurgie seule,
- chirurgie + poly A : poly U.

Les animaux ont été suivis jusqu'à leur mort et la pratique des autopsies a été systématique. Les résultats sont les suivants :

	Témoins	Poly A Poly U	Chirurgie	Chirurgie + Poly A : Poly U
Effectif	41	33	25	23
% métastases	32	42	32	22
Survie moyenne (jours)	78	83	102	132

N.S. $p < 0,02$

$p < 0,02$

Le temps moyen de survie des animaux recevant le poly A : poly U seul ne diffère pas de manière appréciable de celui des témoins. La chirurgie augmente le temps moyen de survie de 30 % par rapport aux témoins. Les meilleurs résultats sont obtenus dans le groupe recevant chirurgie + poly A : poly U, dont la survie moyenne est augmentée de 69 % par rapport aux témoins et de 29 % par rapport au groupe recevant la chirurgie seule.

Bien que le nombre de métastases soit le plus faible dans le dernier groupe, aucune différence significative n'est apparue entre les différents groupes. Il est à noter que le gain de la durée moyenne de survie des animaux fut obtenu en l'absence totale de toxicité du poly A : poly U et en l'absence de tout phénomène de favorisation.

- Chez le hamster :

Les premières expériences réalisées après la mise au point du modèle expérimental le furent dans le but de comparer l'efficacité de nouveaux traitements aux traitements classiques, c'est-à-dire la chirurgie.

1°) Action du TEIB

Le premier produit utilisé fut le 2, 3, 5 triéthylène immino 1, 4 benzoquinone que nous désignerons sous le sigle TEIB. Il s'agit là

d'une substance utilisée pour la première fois par G. KLEIN qui signala qu'elle induisait une réaction cutanée d'hypersensibilité retardée. Ce produit est administré en injections quotidiennes intra-tumorales à des doses variant de 5 à 20 µg par injection selon la taille de la tumeur (les injections débutent lorsque la tumeur mesure 3 à 5 mm de diamètre). La première expérimentation menée sur 10 animaux traités et 10 témoins fut instructive à plusieurs égards : la survie moyenne des témoins était de 63 $\pm$ 16,2 jours, celle des animaux traités par TEIB de 95,6 $\pm$ 15,2 jours, la différence entre ces moyennes étant significative au seuil de 5 %. Ainsi le premier point acquis était que l'administration de TEIB seul suffisait à augmenter de manière significative la survie des animaux.

Nous avions également pu suivre l'action du TEIB sur les tumeurs : après 2 à 3 injections, on note sur les tumeurs l'apparition d'une phlyctène, suivie d'une ulcération et d'une nécrose des tissus avoisinants. Ainsi les injections se traduisent par une nécrose de tous les tissus tumoraux. Si les injections sont arrêtées lorsqu'on ne palpe plus de tissus tumoraux (reconnaissables par leur induration), on assiste à la formation d'une cicatrice scléreuse. Ainsi le TEIB est capable de détruire les tumeurs, et lors de cette première expérience, aucune récidive locale n'a été notée chez les animaux traités par TEIB.

Par contre le TEIB ne modifiait pas le taux de métastases ganglionnaires en particulier, qui était de 100 % dans les 2 groupes.

2°) Actions comparées du TEIB et de la chirurgie

Une seconde expérience fut alors réalisée de manière à comparer l'effet sur la survie des animaux, du TEIB et de la chirurgie.

Le groupe témoin comportait 7 animaux, la survie moyenne fut de 64,3 jours. Le groupe traité par TEIB comportait 9 animaux et la survie moyenne fut de 106 jours. Enfin le 3ème groupe, traité par chirurgie, comportait 13 animaux et leur survie moyenne fut de 92 jours. L'analyse de variance pratiquée sur les résultats permet de montrer que globalement les survies moyennes des 3 groupes étaient différentes, la différence se localisant en fait entre témoins et traités, aucune différence n'étant mise en évidence entre les 2 groupes traités.

Dans les 3 groupes, les taux de métastases lors de l'autopsie étaient voisins de 100 %. On disposait donc à la suite de ces 2 expériences, d'un produit d'efficacité comparable à celle de la chirurgie. On peut résumer ces 2 premières expériences par le tableau suivant :

	Témoins	TEIB	Chirurgie
n +	17	19	13
m ++	63,4	100	92

N.S.

$p < 0,05$

$p < 0,05$

\+ Effectif
++ Survie moyenne (jours)

Au cours de ces 2 expériences :

- aucune récidive tumorale ne fut observée,

- on ne nota l'apparition d'aucun décès précoce dans les groupes traités par TEIB, les premiers décès étant toujours survenus dans le groupe témoin.

Ainsi, à l'issue de ces expériences, nous disposions d'un produit :

- dénué de toute toxicité,

- capable de détruire les tumeurs de manière irréversible,

- dont l'efficacité sur la survie et les métastases était comparable à celle de la chirurgie, thérapeutique classique du mélanome.

3°) Action des polyribonucléotides synthétiques, en tant qu'adjuvants de la chirurgie

La deuxième partie de l'expérimentation avait pour but d'étudier l'efficacité de thérapeutiques à visée immunitaire, les polyribonucléotides synthétiques double chaîne.

a) le poly A : poly U

Nous avons réalisé une expérience de manière à pouvoir comparer les survies moyennes de 3 groupes d'animaux constitués par tirage au sort :

- un groupe témoin ne recevant aucun traitement après la greffe tumorale,

- un groupe traité par chirurgie d'exérèse,

- un groupe traité par chirurgie, puis par des injections intra-péritonéales de poly A : poly U. Les doses de poly A : poly U administrées au cours de cette expérience furent de 1800 µg par animal réparties en 6 injections en 3 semaines.

Les résultats furent les suivants :

	Témoins	Chirurgie	Chirurgie + Poly AU
Effectif	10	10	10
Survie moyenne (jours)	52,4	65,2	84,1
Variance	61	105	625

Figure 1 et Figure 2.

Les résultats de cette expérience sont les suivants :

- il n'existe aucun phénomène de toxicité ni aucun phénomène de favorisation du fait du poly A : poly U. Il n'existe en effet qu'un seul décès précoce dans le groupe traité par poly A : poly U, et les autres décès dans ce groupe surviennent alors que 50 % des témoins sont déjà décédés.

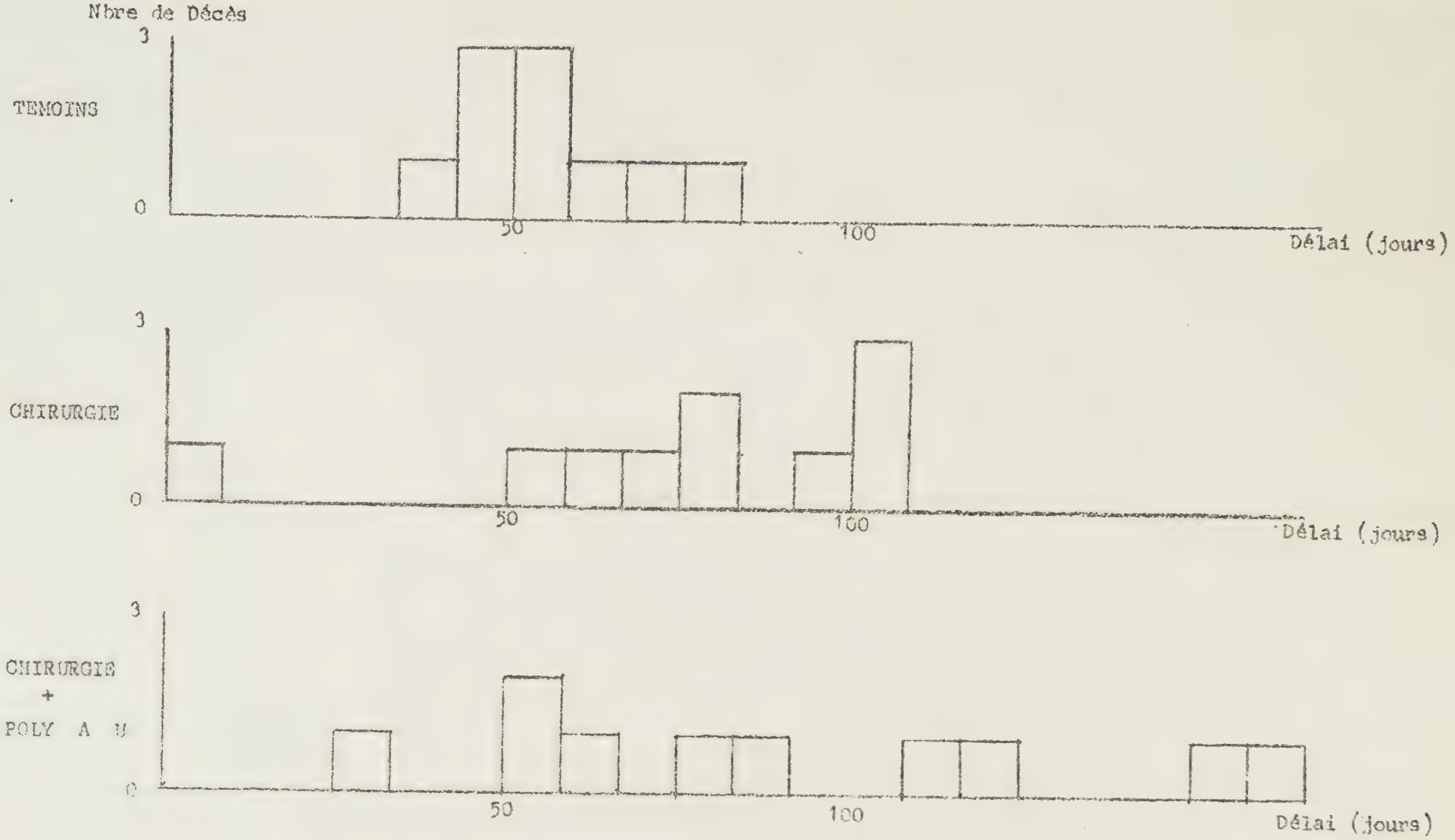

Fig. 1 - Répartition des décès en fonction du temps.

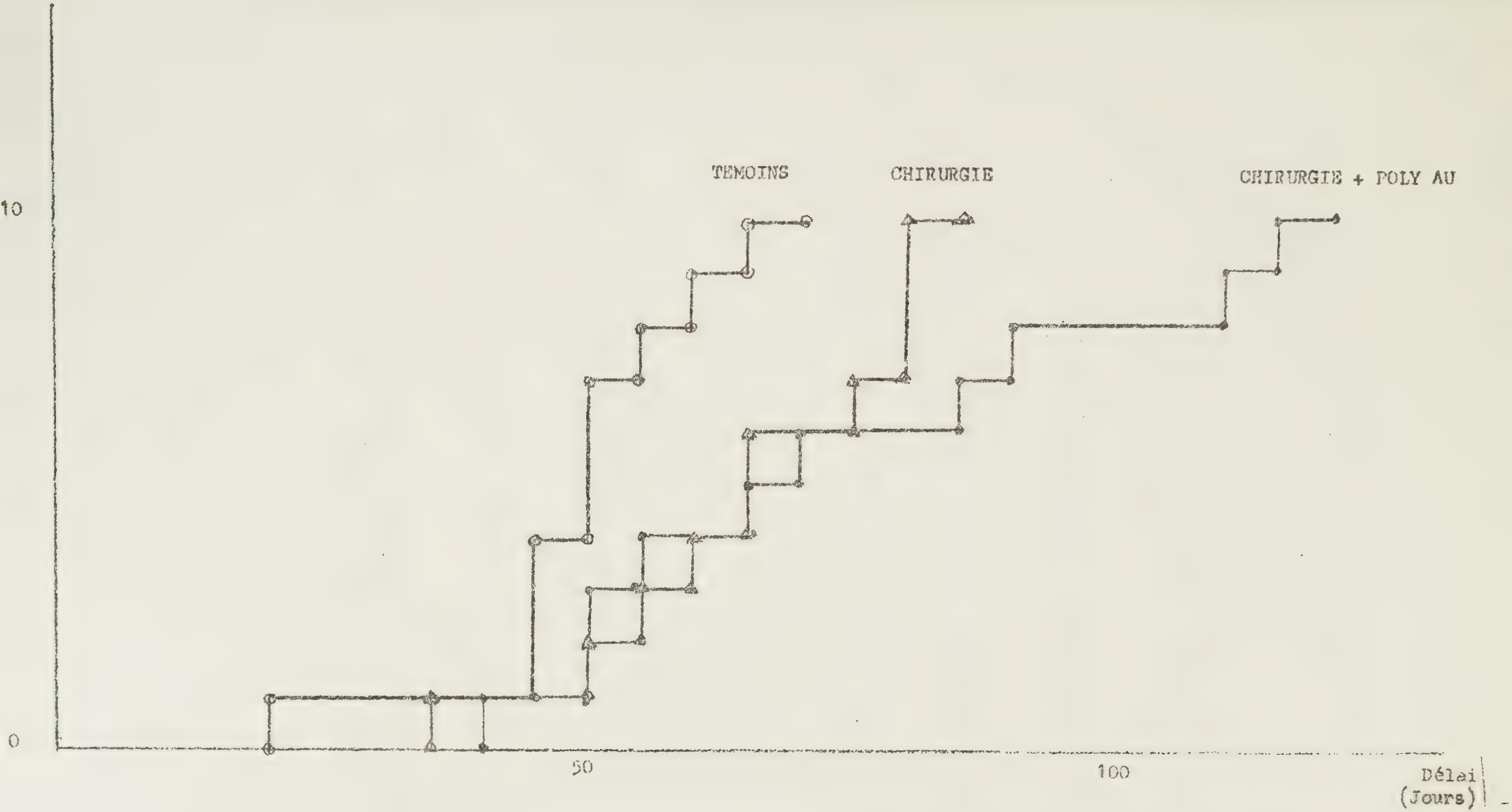

Fig. 2 - Histogramme cumulatif des décès.

- par ailleurs, et malgré les effectifs très réduits de nos groupes, on peut constater que les distributions des décès dans le temps ne sont pas identiques dans les 3 groupes. Nous avons pour cette raison, pratiqué une comparaison des temps moyens de survie à l'aide d'un test non paramétrique ne faisant aucune hypothèse sur les distributions (test U de Mann et Whitney) :

- chirurgie par rapport aux témoins : différence significative $p < 0,04$,

- chirurgie + poly A : poly U par rapport aux témoins : différence significative, $p < 0,02$,

- chirurgie par rapport à chirurgie + poly A : poly U : différence non significative.

b) le poly I : poly C

Une seconde expérience analogue à la précédente fut réalisée, mais en utilisant un autre polyribonucléotide synthétique, l'acide polyinosinique - poly cytidilique (poly I : poly C).

Le poly I : poly C se différencie du poly A : poly U par le fait qu'il est un très bon inducteur de la synthèse d'interféron, alors que le poly A : poly U n'est que faiblement inducteur de cette synthèse, mais par contre le poly I : poly C est beaucoup plus toxique que le poly A : poly U.

En respectant le même protocole expérimental, les résultats suivants ont été obtenus :

	Témoins	Chirurgie	Chirurgie + Poly IC
Effectif	10	10	10
Survie moyenne (jours)	55,8	82,8	85,9
Variance	86,4	624	832

Figure 3 et Figure 4.

La première constatation qui s'impose est que, comme lors de la précédente expérience, l'effet des traitements se manifeste non seulement par un déplacement de la survie moyenne des animaux du groupe, mais également par une modification de la distribution des temps de survie, avec un étalement des distributions.

En utilisant le même test non paramétrique que précédemment, les résultats sont les suivants :

- chirurgie par rapport aux témoins : différence significative, $p < 1\ \%$.

- chirurgie plus poly AU par rapport aux témoins : différence significative, $p < 1\ \%$.

- pas de différence significative entre les 2 groupes traités.

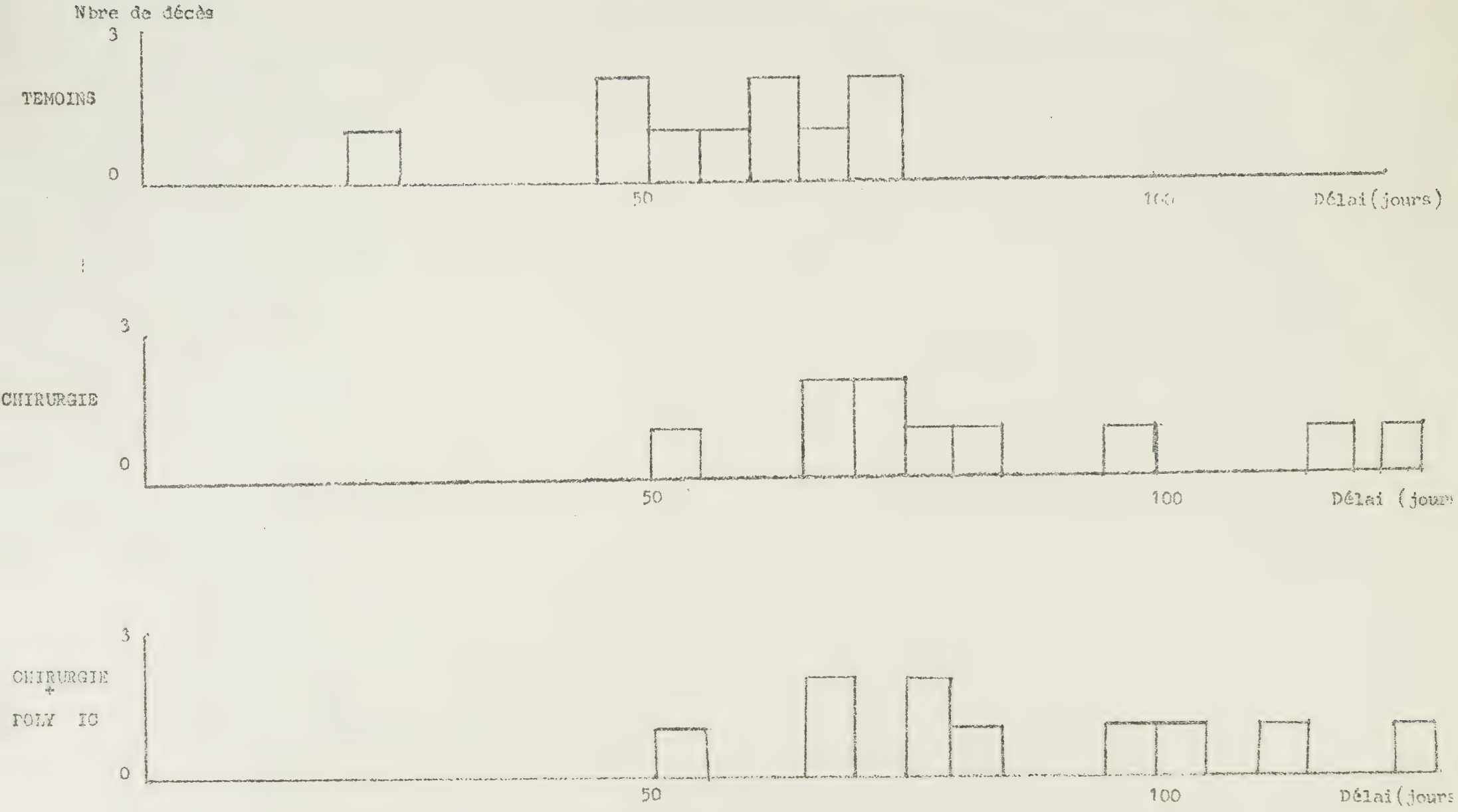

Fig. 3 - Répartition des décès en fonction du temps.

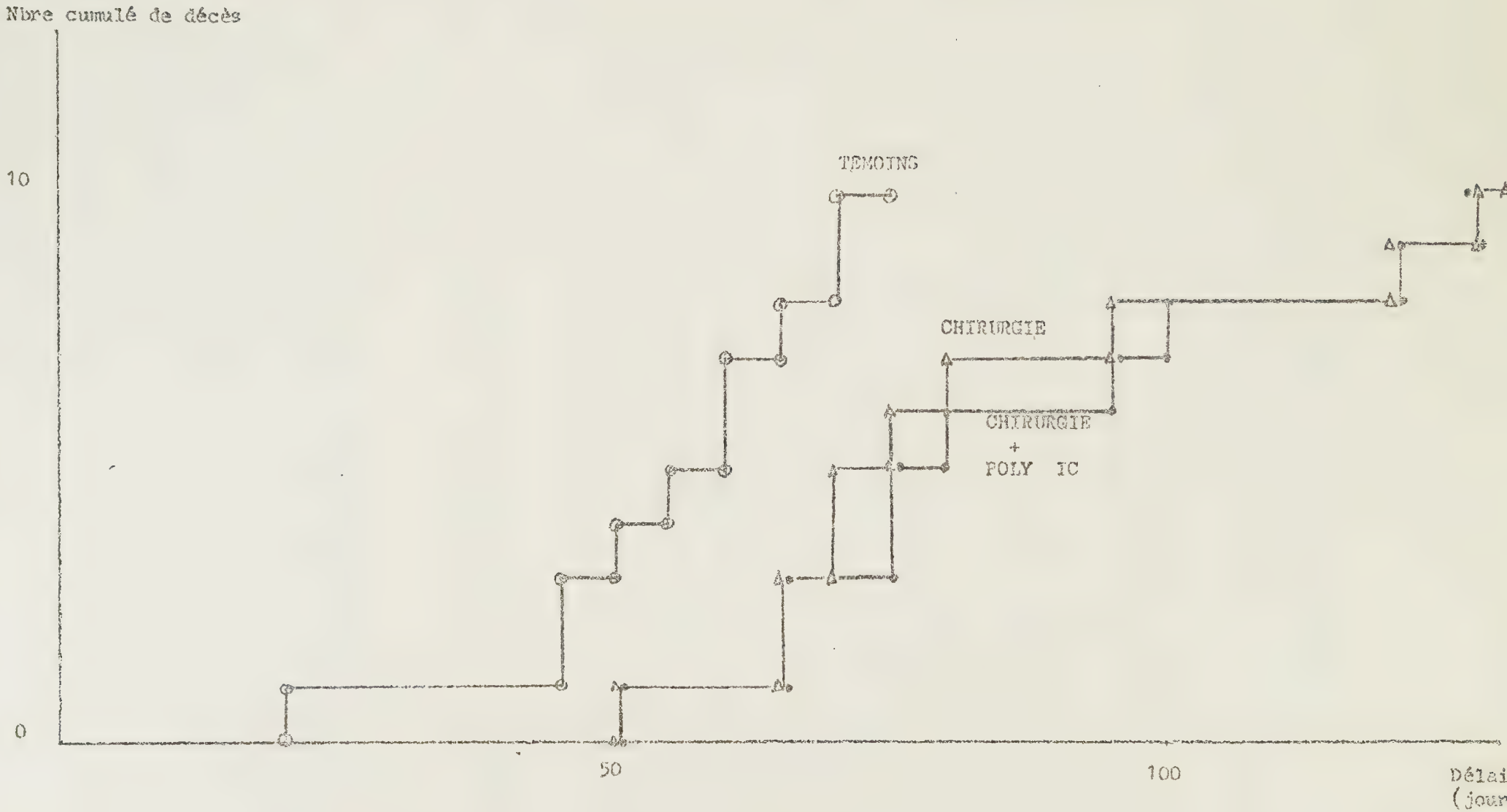

Fig. 4- Histogramme cumulatif des décès.

Ainsi ces 2 expériences ont permis de montrer :

- que le traitement chirurgical pratiqué seul permet d'augmenter très nettement la survie des animaux,

- que l'adjonction d'un polyribonucléotide synthétique à ce traitement augmente la survie des animaux, mais de manière non significative,

- que la pratique d'un traitement modifie la distribution des survies, comme si quelques animaux ne bénéficiaient pas du tout du traitement alors que quelques autres en tirent un grand bénéfice. La taille des échantillons utilisés était cependant trop petite pour permettre de tirer des conclusions de cette observation, qui aurait avant toute chose nécessité une confirmation sur des échantillons plus importants.

Lors des autopsies qui ont été systématiquement pratiquées au cours de ces expériences, nous avons noté le nombre de métastases, le poids des adénopathies métastatiques et le poids de la rate de chaque animal.

Le taux de métastases est de 100 % dans tous les groupes, quel que soit le traitement, lorsqu'on suit l'animal jusqu'à sa mort spontanée

Le poids moyen des adénopathies métastatiques se situe entre 19 et 32 gr dans les différents groupes, sans qu'aucune différence n'apparaisse entre les groupes (il faut signaler ici que pour 1 animal, les adénopathies pesaient 83 gr alors que l'animal entier pesait 135 gr, adénopathies comprises).

Enfin, plus qu'au poids de la rate elle-même, nous nous sommes intéressés au logarithme du rapport du poids de la rate au poids du hamster.

Le traitement par le poly AU n'a entraîné aucune modification de ce rapport par comparaison aux témoins, par contre le traitement par le poly I : poly C a augmenté la valeur de ce rapport, bien que de manière non significative.

	Témoins	Chirurgie	Chirurgie + Polyribonucléotide	
Poly A:Poly U Exp. 1	1,69	1,60	1,43	NS
Poly I:Poly C Exp. 2	1,72	1,33	2,17	NS

Valeur du Log $\frac{\text{Rate}}{\text{Hamster}}$

Par ailleurs ces rates ont subi un examen histologique systématique. Dans 30 % environ des rates des animaux qui ont reçu un polyribonucléotide, on trouve une hypertrophie de la pulpe blanche, celle-ci ne pouvant être appréciée de manière absolue mais par comparaison avec les rates des animaux témoins. Ces résultats sont particulièrement nets en ce qui concerne les animaux ayant reçu du poly A : poly U. Seulement 10 animaux ont reçu du poly I : poly C, et cet effectif est trop faible pour permettre quelque conclusion que ce soit.

4°) Action conjointe du TEIB et du poly A : poly U

A la suite de ces expériences, ayant porté d'une part sur l'efficacité du TEIB, d'autre part sur l'efficacité d'un polyribonucléotide synthétique, nous avons utilisé ces deux thérapeutiques de manière conjointe :

a) Sur la survie.

Trois groupes d'animaux ont été constitués par tirage au sort :

- les animaux du groupe témoin n'ont reçu aucun traitement,

- les animaux du second groupe ont reçu du TEIB intra-tumoral selon le protocole déjà décrit,

- les animaux du 3ème groupe ont reçu TEIB intra-tumoral + poly A : poly U par voie intra-péritonéale. Les effectifs initialement prévus étaient de 20 animaux témoins et 30 par groupe traité. Les manquants dans le tableau des résultats s'expliquent par des causes indépendantes de la maladie et du traitement (fuites, cannibalisme).

Les résultats obtenus, en ce qui concerne la survie moyenne des animaux, ont été les suivants :

	Témoins	TEIB	TEIB + Poly A : Poly U	
Effectif	19	30	28	
Survie moyenne (jours)	64,3	81,6	85,6	
Variance	212	512	583	
Log $\frac{\text{Rate}}{\text{Hamster}}$	1,45	1,36	1,50	NS

L'analyse de variance pratiquée sur ces résultats montre que :

- on ne met pas en évidence de différence significative entre les 2 groupes traités, par contre ils diffèrent tous les deux ($p < 1\ \%$) du groupe témoin.

- les traitements paraissent sans effet marqué sur le poids de la rate. Ainsi cette expérience :

. confirme l'effet bénéfique sur la survie moyenne des injections intra-tumorales de TEIB (signalons en outre qu'aucune récidive tumorale locale n'a été observée chez les animaux traités par TEIB),

. Montre encore une fois que la survie des animaux recevant poly A: poly U est légèrement prolongée quoi que non significativement, mais que ces animaux décèdent porteurs de métastases, ganglionnaires en particulier. Nous avons cependant relevé le délai d'apparition des métastases ganglionnaires, tel qu'il pouvait être noté par la palpation bi-hebdomadaire des aires ganglionnaires axillaires et inguinales bilatérales.

Les délais moyens sont les suivants dans les différents groupes :

Témoins ..... 24 jours

TEIB ..... 43 jours

TEIB + Poly A : Poly U . 45 jours

Il s'agit là de délais moyens qui sont connus avec une grande imprécision pour deux raisons :

- il ne s'agit que du résultat d'une palpation et une adénopathie peut-être palpable chez un animal amaigri alors qu'elle ne le serait pas encore chez un animal possèdant un important tissu adipeux,

- cette palpation n'a été que bi-hebdomadaire.

La conséquence prévisible de cet état de faits est que la variance de ces délais moyens est très importante. Si on pratique un test pour comparer globalement ces trois moyennes, il n'existe aucune différence significative. Cependant, on peut noter une tendance qui est celle d'un retard à l'apparition des adénopathies lorsque les animaux sont traités.

Notre but fut, par la suite, d'essayer de vérifier l'existence d'un tel retard dans l'apparition des adénopathies métastatiques.

b) Sur la date d'apparition des adénopathies.

Dans ce but l'expérience suivante fut organisée : 120 hamsters furent répartis par tirage au sort parmi les 5 groupes thérapeutiques suivants :

- témoins sans traitement,
- chirurgie seule,
- TBIB intra-tumoral seul,
- chirurgie + poly A : poly U,
- TBIB intra-tumoral + poly A : poly U,

chacun des traitements pouvant être pratiqué pendant 6 durées différentes : 9, 11, 13, 15, 17 ou 19 jours. Ainsi, finalement, chaque hamster se voyait attribuer l'une des 30 combinaisons possibles. La répartition fut la suivante :

Durée du traitement en jours \ Traitement	0	Chirurgie	TBIB	Chirurgie + PolyA PolyU	TBIB + PolyA PolyU
9	4	4	4	4	4
11	4	4	4	4	4
13	4	4	4	4	4
15	4	4	4	4	4
17	4	4	4	4	4
19	4	4	4	4	4

Total : 120

24 heures après la fin du cycle thérapeutique prévu, les hamsters étaient sacrifiés et l'on a systématiquement prélevé :

- la tumeur si elle persistait, ou la cicatrice résultant de sa régression,

- les adénopathies axillaires et inguinales bilatérales. Dans tous les cas, que des adénopathies soient macroscopiquement visibles ou non, nous avons prélevé la totalité du tissu cellulaire sous-cutané et du tissu adipeux des aires axillaires et inguinales bilatérales. Après fixation dans l'AFA *, les blocs furent coupés au bistouri en tranches fines et examinés au microscope,

- les 2 poumons,

- la rate,

- les adénopathies mésentériques dès qu'existait un doute quant à leur nature histologique.

En ce qui concerne les adénopathies métastatiques, les résultats ont été les suivants :

* Alcool absolu 75 %, formol 20 %, acide acétique 5 %.

Durée en jours \ Traitement	Témoins	Chirurgie	TEIB	Chirurgie + Poly AU	TEIB + Poly AU	Total
9	2/4	4/4	3/4	1/4	2/4	12/20
11	2/4	3/4	2/4	1/4	2/4	10/20
13	3/4	2/4	1/4	2/4	1/4	9/20
15	4/4	4/4	4/4	2/4	4/4	18/20
17	4/4	3/4	3/4	3/4	0/4	13/20
19	4/4	4/4	3/4	1/4	2/4	14/20
TOTAL	19/24	20/24	16/24	10/24	11/24	

L'analyse pratiquée sur ces résultats montre que :

- globalement, il n'existe pas d'effet durée", c'est-à-dire que le nombre de métastases est le même quelle que soit la durée du traitement (conformément X^2 = 11, preuve significatif).

- il existe un "effet traitement", c'est-à-dire que le nombre total d'adénopathies n'est pas le même quel que soit le traitement (X^2 = 14,85 à 4 degrés de liberté, $p < 0,01$).

Le degré de signification de cette différence est encore plus important si on pratique une comparaison qui prenne en compte les délais différents par l'utilisation d'une méthode d'ajustement (X^2 ajusté = 23,23 $p < 0,001$).

Compte tenu des hypothèses faites a priori sur l'efficacité comparée des différentes thérapeutiques et qui découlent des résultats des expériences précédentes, on peut tenter de localiser les différences :

- les groupes témoins, TBIB et chirurgie ne diffèrent pas de manière significative,

- de la même manière, on ne décèle pas de différence entre les groupes TBIb + Poly A : Poly U et le groupe chirurgie + Poly A : Poly U,

- il existe une différence significative entre les groupes recevant du poly A : poly U et ceux qui n'en reçoivent pas.

Il apparaît donc que l'adjonction de poly A : poly U à un traitement visant à réduire le volume tumoral (qu'il s'agisse du TBIB ou de la chirurgie), permet de retarder l'apparition des métastases pulmonaires. Il ne s'agit bien là que d'un retard dans l'apparition des métastases, puisqu'on a vu précédemment que si les animaux, même traités par le poly A : poly U, sont suivis jusqu'à leur mort, ils présentent des métastases dans 96 % à 100 % des cas.

L'effet du poly A : poly U, adjuvant d'une thérapeutique de réduction tumorale, se traduit donc par :

- une augmentation marquée du temps de survie des animaux,

- un retard dans l'apparition des adénopathies.

On peut en outre penser qu'il existe une relation entre ces deux phénomènes et que tout se passe comme si, à la suite de la réduction du volume tumoral et de l'action du poly A : poly U, l'animal se défend mieux contre l'évolution de sa maladie. Cette meilleure défense se traduit par une évolutivité moins marquée, mais n'est cependant pas suffisante pour guérir l'animal.

Nous avons également étudié, au cours de cette expérience, le logarithme du rapport du poids de la rate au poids du hamster et ses modifications sous l'influence des différents traitements (nous appellerons R ce rapport).

Un premier point à noter est l'existence d'une relation positive entre le poids de la tumeur et R chez les animaux du groupe témoin :

$r = 0,58$ (ddl = 22), significatif $p < 0,01$.

Il existe par ailleurs une liaison négative entre le nombre d'injections de TEIB et R :

$r = - 0,34$ (ddl = 46), significatif $p < 0,01$.

L'influence du TEIB sur le poids de la rate se trouve confirmée par l'étude de R en fonction des différents traitements pratiqués :

	n	m	
Témoins	24	0,587	NS
Chirurgie	24	0,284	
Chirurgie + Poly A : Poly U	24	0,429	p < 0,05
TEIB	24	0,191	NS
TEIB + Poly A : Poly U	24	0,223	

Ainsi, pour les animaux traités par chirurgie, R ne semble pas modifié par rapport aux animaux témoins, par contre lorsque les animaux reçoivent des injections intra-tumorales de TEIB, R est diminué par rapport aux animaux témoins.

E. Discussion

Les expériences dont nous venons de rapporter les résultats nous ont permis de constater que :

1°) Le TEIB possède à la fois une action locale de lyse tumorale et une action générale se traduisant par une augmentation de la survie des animaux.

2°) Le Poly A : Poly U peut être considéré comme un adjuvant intéressant du TEIB ou de la chirurgie, son action se traduisant par un retard dans l'apparition des métastases.

Le TEIB est un produit connu pour induire une réaction d'hypersensibilité cutanée retardée. On peut, sur cette base, tenter de comprendre le mécanisme de l'action anti-tumorale de cette substance. Le résultat obtenu sur l'évolution de la tumeur peut être celui d'une interaction entre lymphocytes et cellules tumorales. Il n'existe en effet pas, in vitro, de cytotoxicité du TEIB, mais celui-ci provoque seulement un arrêt de la croissance des colonies. Plusieurs raisons peuvent expliquer qu'"in vivo" les lymphocytes sont devenus plus aptes à attaquer les cellules tumorales.

- les injections provoquent une inflammation locale accompagnée d'un afflux de lymphocytes.

- les phénomènes inflammatoires s'accompagnent également d'une modification de la perméabilité vasculaire, permettant aux lymphocytes de pénétrer plus facilement dans la tumeur.

L'afflux de lymphocytes, de manière plus abondante que normalement, au contact des cellules tumorales, n'est cependant pas suffisant en lui-même pour expliquer la destruction tumorale et il faudrait pour ceci en outre supposer que le TEIB modifie les antigènes tumoraux spécifiques en les rendant plus immunogéniques.

W. CAVINS (1971) a rapporté des cas de guérisons d'épithéliomas cutanés baso-cellulaires sous l'influence du TEIB. Bien qu'ayant obtenu des cures de mélanomes malins chez le hamster, il paraît prématuré d'envisager le traitement du mélanome malin de l'homme par le TEIB, du moins lorsqu'un acte chirurgical est possible. Cependant, chez certains malades porteurs de mélanomes malins cutanés, l'extirpation chirurgicale de la tumeur primitive est suivie, à plus ou moins brève échéance, par l'apparition de nombreuses récidives loco-régionales, dont l'exérèse chirurgicale est difficile, voire impossible. Il nous apparaît que chez de tels malades, l'utilisation en clinique humaine du TEIB est possible, dans un but de réduction du volume tumoral, ce qui est le but initial de toute thérapeutique anticancéreuse.

Le mécanisme d'action du poly A : poly U est plus difficile à expliquer.

Son action adjuvante sur la synthèse des anticorps est maintenant bien connue. SCHMIDTKE et JOHNSON (1971) ont montré que :

- le poly A : poly U diminue la période d'induction de la synthèse des anticorps et augmente leur taux, de manière comparable à celle de l'endotoxine.

- le poly A : poly U contribue à augmenter la mémoire immunologique lors de la réexposition à un antigène donné.

Des modifications physico-chimiques apportées aux molécules du polyribonucléotide bicaténaire permettent de penser que la structure en double chaîne stable est indispensable à l'action adjuvante du poly A poly U.

W. BRAUN (1971) avance des arguments qui permettent de penser que l'un des intermédiaires de l'action du poly A : poly U sur l'activation des cellules immunologiquement compétentes est l'adénosine monophosphate 3' 5' cyclique (AMP cyclique). L'AMP cyclique, en particulier, par son action sur les histones, semble pouvoir stimuler la transformation des cellules immunologiquement compétentes et leur capacité de synthèse des anticorps. WINCHURCH et BRAUN (1971) ont montré que le poly A : poly U exerce un effet de facilitation sur l'enzyme responsable de la transformation de l'ATP en AMP cyclique, l'adényl cyclase.

Par ailleurs, les bases xanthiques, caféine et théophylline en particulier, inhibent l'activité de la phosphodiestérase, enzyme qui permet la transformation rapide de l'AMP cyclique en AMP 5', biologiquement inactif. Or, ces auteurs ont constaté que l'administration de théophylline en même temps que le poly A : poly U, renforce l'effet de ce dernier. Ce phénomène peut s'expliquer par l'existence d'un taux élevé et durable d'AMP cyclique dans les cellules immunologiquement compétentes qui ont été activées par un contact préalable avec un antigène. Ces données ont été confirmées par les travaux, réalisés "in vitro" de

C. GALLO et J. WHANG-PENG (1971). Les auteurs ont en outre montré que l'administration d'AMP cyclique à des doses 100 fois supérieures aux doses stimulantes, provoquait un effet d'inhibition sur la transformation des lymphocytes et leur synthèse d'ADN. Ces résultats confirment les faits expérimentaux observés par BRAUN et ISHIZUKA, qui ont montré que lorsqu'on administre à des animaux des doses progressivement croissantes de poly A : poly U, le taux de cellules immunologiquement compétentes croît progressivement jusqu'à un maximum, puis décroît rapidement à partir d'un certain niveau de poly A : poly U. Ces faits montrent toute la difficulté de l'utilisation du poly A : poly U, tant en expérimentation animale qu'en clinique humaine.

Au vu de ces résultats, on peut tenter d'expliquer les faits que nous avons mis en évidence, en particulier le retard observé dans l'apparition des adénopathies. Les cellules tumorales qui migrent dans la circulation générale et se fixent au niveau des ganglions lymphatiques sont très peu nombreuses au début de l'évolution de la tumeur. Une stimulation immunologique adéquate permet peut-être d'empêcher la multiplication des cellules tumorales. Mais cependant, à partir d'un certain stade de développement, la prolifération tumorale devient trop importante et les défenses de l'organisme sont alors insuffisantes à la stopper. On assiste alors au développement d'une tumeur secondaire, sur l'évolution de laquelle le poly A : poly U reste sans effet. Ceci permet de penser qu'une thérapeutique à visée immunitaire est incapable, par elle-même, de détruire une tumeur, mais qu'elle est seulement capable d'enrayer son évolution initiale.

Il convient cependant d'ajouter que l'on ne peut exclure un autre mode d'action du poly A : poly U, indépendamment ou conjointement à son action sur le système immunitaire.

On peut ainsi marquer les limites de l'immunothérapie anti-cancéreuse, dont l'efficacité dépendra de la taille et de la nature de la masse tumorale résiduelle qui n'aura pu être extirpée par des moyens chirurgicaux, l'étendue et la nature des métastases non accessibles à la chirurgie. En outre, la chimiothérapie anti-tumorale et les radiations étant des agents généralement immunosupresseurs, ils ne ne devraient théoriquement pas être utilisés avant ou pendant la pratique d'une immunothérapie, mais seulement après celle-ci. Il est cependant évident que ce raisonnement ne peut s'appliquer qu'au cas des tumeurs solides (or MATHE et coll. ont montré l'intérêt d'une immunothérapie non spécifique dans certains types de leucémies), et que même pour celles-ci il existe de nombreux cas où la réduction initiale du volume tumoral ne peut être obtenue par des méthodes chirurgicales, mais par l'utilisation des radiations.

V - CONCLUSIONS

Ce travail nous a permis, par une étude bibliographique et une expérimentation animale, d'envisager les possibilités actuelles de l'immunothérapie anticancéreuse non spécifique.

L'évolution rapide des techniques immunologiques et leur précision sans cesse croissante, nous permettent de savoir en quoi, au point de vue immunitaire, une cellule cancéreuse se différencie d'une cellule normale. La mise en évidence de l'existence d'antigènes tumoraux spécifiques de transplantation fut suivie par l'étude des moyens mis en oeuvre par l'organisme pour lutter contre des éléments qu'il sait lui être étrangers mais qu'il est incapable d'éliminer. De cette étude des relations hôte-tumeur naquit l'idée de l'utilisation, en tant qu'adjuvants des thérapeutiques anticancéreuses déjà connues, de substances capables de stimuler, de manière non spécifique, les défenses immunitaires de l'organisme. Nous nous sommes intéressés, dans ce but, à l'utilisation de polyribonucléotides synthétiques. La mise au point d'un modèle chez l'animal nous a permis de prouver l'existence d'un tel effet adjuvant, tout en confirmant l'idée qu'une immunothérapie anticancéreuse est à elle seule incapable d'entraîner la guérison de la maladie cancéreuse. Nous pensons qu'à l'heure actuelle les faits expérimentaux sont suffisamment probants pour rendre licite l'utilisation d'une telle thérapeutique en clinique humaine, en entreprenant tout d'abord la réalisation d'un essai thérapeutique contrôlé.

Nous sommes par ailleurs bien conscients du fait qu'il ne s'agit là que d'une étape minime dans l'utilisation de notre connaissance de l'immunologie dans la lutte anticancéreuse. Le but de cette matière doit en effet se trouver dans la réalisation d'une immunothérapie spécifique, l'objectif final étant la possibilité d'une véritable vaccination anticancéreuse.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ABSHER M., STILNEBRING W.R., Toxic properties of a synthetic double-stranded R.N.A., Nature, 223 : 715 - 717, 1969.

2 - ALEXANDER P. and HAMILTON-FAIRLEY G., Brit. Med. Bull., 23 : 86 - 92, 1967.

3 - AMIEL J.L. and BERARDET M;, Effects of Active Specific and Non-Specific Immunotherapy on E G2 Leukemia According to the Route of Administration and Combination of Immunological Stimulants, Europ. J. Cancer, 7 : 419 - 423,1971.

4 - ATTIA M.AM., DE OME K.B. and WEISS D.W., Cancer Res., 25 : 451 - 457, 1965.

5 - BARD D., The role of the spleen in the immunity to a chemically induced sarcoma in C3H Mice, Cancer Res., 29 : 1125 - 1131, 1969.

6 - BART R.S and KOPF A.W., Inhibition of the growth of murine malignant melanoma with synthetic double-stranded ribonucleic acid, Nature, 224 : 372, 1969.

7 - BAVSEK G.H and MERIGAN T.C, Cell interaction with a synthetic polynucleotide and interferon in vitro, Virology, 39 : 490 - 499, 1969.

8 - BENACERRAF B. : Cell associated immune reactions, Cancer Res., 28 : 1392 - 1398, 1968.

9 - BOYSE E.A, OLD L.J., STOCKERT E. and STJERNSWARD J., Genetic origin of tumor antigens, Cancer Res., 28 : 1280, 1968.

10 - BRAUN W., Nature, 224 :1024, 1969.

11 - BRAUN W. in : "Proc. VI Internat. Congress of Chemotherapy", Tokyo, 1970.

12 - BRAUN W. and ISHIZUKA M., Antibody formation : reduced responses after administration of excessive amounts of non-specific stimulators, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68 : 1114 - 1116, 1971.

13 - BRAUN W., NAKANO M., JARAKOWA L., YAJIMA Y. and JIMENEZ L., in "Nucleic Acids in Immunology", O.J. PLESCIA and W. BRAUN eds, Springer-Verlag, N.Y., 1968.

..../

14 - CAVIUS J.A., Review of a 3-year experience with topical chemotherapy and immunotherapy of superficial cutaneous neoplasms, J. Surg. Oncol., 3 : 325 - 329, 1971.

15 - CAME P.E. and MOORE D.H., Inhibition of spontaneous mammary carcinoma of mice by treatment with interferon and Poly I.C., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 137 : 304 - 305, 1971.

16 - de CLERCQ E., Requirement of a stable secondary structure for the antiviral activity of polynucleotides, Nature, 222 : 1148 - 1152, 1969.

17 - COHEN E.P : On the mechanism of immunity in defense evolution, Ann. Rev. Microbiol. 22 : 283 - 304, 1968.

18 - COOPER H.L and RUBIN A.D, RNA Metabolism in lymphocytes stimulated by PHA : Initial response to PHA, Blood, 25 : 1014 - 1021, 1963.

19 - DAVID J.R : Cell-associated hypersensitivity studied in vitro, Cancer Res., 28 : 1387 - 1391, 1968.

20 - DENOIX P., La Maladie Cancéreuse, pp. 203 - 210.

21 - DEODHAR S.D., KIKLINCA A.G. : Development of reticulum cell sarcoma at the site of antilymphocyte globulin injection in a patient with renal transplant, New. Eng. J. Med., 280 : 1104 - 1106, 1969.

22 - DVORAK R., Resistance and susceptibility to tumors : II. An attempt to heal mice bearing the B04 tumor, using transfered mice spleen cells. Neoplasma, 16 : 11 - 15, 1969.

23 - FAIRLEY G.H., Immunity to malignant disease in man, Brit. Med. J., 2 :467 - 472, 1969.

24 - FIELD A.K., TYTELL H.A., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 58 : 1004, 1967.

25 - FISHER J.C, GRACE W.R and MANNICK J.A., The effect of non specific immune stimulation with corynebacterium parvum on patterns of tumor growth, Cancer, 26 : 1379 - 1382, 1970.

26 - The Immunological Ochestra (Editorial), Lancet i : 185 - 186, 1968.

..../

27 - GALLO R.C and WHANG-PENG J., Enhanced transformation of human immunocompetent cells by dibutyryl adenosine cyclic 3'-5' monophosphate, J. Nat. Cancer Inst. 47 : 91 - 94, 1971.

28 - GELBOIN H.V and LEVY H.B., Poly I Poly C inhibits chemically induced tumorogenesis in mouse skin, Science, 167 : 205 - 207, 1970.

29 - GERSHON R.K., Mechnism by which the spleen may act in regulating tumor immunity after tumor resection, J. Nat. Cancer. Inst., 43 : 545 - 551, 1969.

30 - GERSHON R.K., Factors controlling concomittant immunity in tumor-bearing hamsters : effects of prior splenectomy and tumor removal, J. Nat. Cancer Inst., 43 : 533 - 543, 1969.

31 - GERY I., The relationship between lymphocyte transformation and immune response, Immunology, 16 : 381 - 386, 1969.

32 - GOLDNER H., GIRARDI A.J., LARSON V.M., and HILLEMAN M.R., Proc. Soc. Exptl., Biol. Med., 117 : 851 - 857, 1964.

33 - GRESSER I. and BOURALI C., Exogenous interferon and inducers of interferon in the treatment of Balb - C mice inoculated with RC 19 tumor cells, Nature, 223 : 844 - 845, 1969.

34 - GROSS L., Transmission of Cancer in Man, Cancer, 28 : 785 - 788, 1971.

35 - HABEL K., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 106 : 722 - 725, 196 ,

36 - HADDOW A. and ALEXANDER P., Lancet, i, 452 - 455, 1964.

37 - HELLSTRÖM I., SJÖGREN H.O, WARNER G., HELLSTRÖM K.E, Blocking of cell-mediated tumor immunity by sera from patients with growing neoplasms, Int. J. Cancer, 7 : 226 - 237, 1971.

38 - HELLSTRÖM I., HELLSTRÖM R.E, EVANS C.A, HEPPNER G.H, PIERCE G.E. and YANG J.P.S, Serum-mediated protection of neoplastic cells from inhibition by lymphocytes immune to their tumor-specific antigens, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A, 62 : 362 - 368, 1969.

..../

39 - HELLSTRÖM I., HELLSTRÖM K.E., PIERCE G.E and YANG J.P.S, Nature, 220 : 1352 - 1354, 1968 d.

40 - HELLSTRÖM K.E and HELLSTRÖM I., Cellular Immunity to different types of human neoplasms, Nature 220 : 1352 - 1354, 1968.

41 - HELLSTRÖM K.E and HELLSTRÖM I., Cellular Immunity against tumor antigens, adv. in Cancer Res., 12 : 167 - 223, 1969.

42 - HELLSTRÖM I. and HELLSTRÖM K.E, Colony inhibition studies on blocking and non-blocking serum effects on cellular immunity to moloney sarcomas, Int. J. Cancer, 195 - 200, 1970.

43 - HELLSTRÖM I., PIERCE G.E and HELLSTRÖM K.E, Human Tumor-specific antigens, Surgery, 65 : 984 - 989, 1969.

44 - HOERNI B., Principes de l'immunothérapie des Cancers, Bordeaux Med., 2 : 297 - 306, 1969.

45 - HUGHES L.E and MACKAY W.D., Suppression of the tuberculin response in malignant disease, Brit. Med. J., 2 : 1346 - 1348, 1965.

46 - IKONOPISOV R.L., LEWIS M.G.? HUNTER-CRAIG I.D., BODENHAM D.C., PHILLIPS T.M, COOLING C.I., PROCTOR J., FAIRLEY G.H., ALEXANDER P., Autoimmunization with irradiated tumour cells in human malignant melanoma, Brit. Med. J., 2 : 752 - 754, 1970.

47 - IRIE K., IRIE R.F., Immunological suppression of the occurence of spontaneous mammary tumours in C3H/HE mice, Nature, 233 : 133 - 134, 1971.

48 - ISHIZUKA M., GAFNI M. and BRAUN W., Cyclic AMP, effects on antibody formation and their similarities to hormone-mediated events (34921), Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 134 : 963, 1970.

49 - Mc KHANN C.F., Primary Malignancy in Patients under going immunosuppression for renal transplantation, Transplantation, 8 : 209 - 212, 1969.

50 - KLEIN E., Federation Proc., 28 : 1739, 1968.

51 - KLEIN E., Local cytotatic chemotherapy and immunotherapy, Geriatrics,23:154-175,1968

.../

52 - KLEIN G. and VETTGEN H.F, Immunologic factors involved in the growth of primary tumors in human or animal hosts, Cancer Res., 29 : 1741 - 1746, 1969.

53 - KLEING., Ann. Rev. Microbiol., 20 : 223 - 252, 1966.

54 - KLEIN G., KLEIN E. and HAUGHTON G., Variations of antigenic cheracteristics between different mouse lymphomas induced by the Moloney virus, J. Nat. Cancer Inst., 36 : 607, 1966.

55 - KRONHAN B.S., Tumor-specific antigens detected by inhibition of macrophage migration, Science, 165 : 296 - 297, 1969.

56 - LACOUR F., LACOUR J., FLAMANT R., Essai thérapeutique sur le cancer mammaire spontané de la souris : chirurgie + ARN synthétique (poly A : poly U), Mem. Acad. Chir., Paris, 96 : 364 - 368, 1970.

57 - LACOUR F., MICHELSON A.M. and NAHON E., Specific antibodies to polynucleotide complexes and their reaction with nucleic acids : importance of the secondary structures of the antigen, in "Nucleic Acids in Immunology", OJ. Plescia and W. Braun, ads, N-Y.

58 - LARSON V.M., CLARK W.R., DAGLE G.E and HILLEMAN W.R., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 132 : 602, 1969.

59 - LEVIN A.G., Lymphocytes transfer tests in Cancer patients and healthy people, Cancer, 22 : 500 - 506, 1968.

60 - LEVY H.B., Inhibition of tumour growth by poly I poly C acid, Proc. Nat. Acad. Sci., 62 : 357 - 361, 196 .

61 - LEWIS M.G., IKONOPISOV R.L., NAIRN R.C., PHILLIPS T.M., HAMILTON FAIRLEY G., BODENHAM D.C. and ALEXANDER P., Tumor-specific antibodies in human malignant melanoma and their relationship to the extent of the disease, Brit. Med. J., 3 : 547 - 552, 1969.

62 - LEWIS M.G., KIRYABWIRE J.W.M, Aspects of Behaviour and natural history of malignant melanoma in Uganda, Cancer, 876 - 887, 1968.

..../

63 - LINDSAY A.L. and TROWN P.W., Pyrogenicity of poly I poly C in rabbits, Nature, 223 : 717, 1969.

64 - LISKIN George, Sex factors in growth of malignant melanoma in hamsters : in vivo and in vitro correlations, Cancer Res., 30 : 1928 - 1930, 1970.

65 - MATHE G., AMIEL J.L., SCHWARZENBERG L., SCHNEIDER M., HAYAT M., Remission induction with poly IC in patients with acute lymphoblastic leukemia, Rev. Europ. Etud. Chir. Biol., 15 : 671 - , 1970.

66 - MATHE G., SCHWARZENBERG L., AMIEL J.L., SCHNEIDER M., CARRAN A., and SCHLUMBERGER J.R., Cancer Res., 27 : 2542 - 2553, 1967.

67 - MATHE G., Sur l'étude d'animaux et de patients atteints de cancer et sur les essais d'immunothérapie, Bull. Cancer, 54 : 377 - 382, 1967.

68 - MATHE G., Les réactions immunologiques et l'évolution des cancers, Europ. J. Cancer, 1 : 1 - 14, 1965.

69 - MICHIE D., The Biometrics of the spleen weight essay.

70 - MAKINODAN J., growth patterns of antibody - forming cell population, Cur. Top. Microbiol. Immunol. 49 : 80 - 113, 1969.

71 - MORJON D.L., Science, 162 : 1279, 1968.

72 - MORTON D.L., GOLDMAN L. and WOOD D.A., Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 6 : 47, 1965.

73 - HUNA N.M., Detection by immunofluorescence of antibodies specific for human malignant melanoma, Cancer, 23 : 88 - 93, 1969.

74 - NAGEL G.A., Cell mediated immunity against malignant melanoma in monozygous twins, Cancer Res., 30 : 1828 - 1832, 1970.

75 - NAHON E., MICHELSON A.M et LACOUR F., Antigénicité des complexes de polynucléotides, Bioch. Bioph. Acta, 149 : 127 - 139, 1967.

..../

76 - OLD L.J., BOYSE E.A., GEERING G. and OETTGEN H.F., Serologic approaches to the study of cancer in animals and in man, Cancer Res., 28; 1288 - 1299, 1968.

77 - PASTAN I and PERLMAN R.L., Cyclic AMP in Metabolism, Nature, Nero-Biology,

78 - PIESSENN W.F., Evidence for human Cancer Immunity.

79 - PREHN R. T and MAIN J. M., J. Nat. Cancer Inst., 18 : 769, 1957.

80 - RICHARD H., ADAMSON A., Embryotoxic effect of poly I poly C, Nature, 223 : 718, 1969.

81 - RHIM J.S., GREENAWALT C. and HUEBNER R.J., Synthetic double-stranded RNA, inhibitory effect on murine leukemia and sarcoma viruses in cell cultures. Nature, 222 : 1166 - 1168, 1969.

82 - RIGBY P.G., Prolongation of survival of tumor bearing animals by transfer of "immune" RNA with DEAE Dextran, Nature, 221 : 968 - 969, 1969.

83 - RIGBY P.G., The effect of "exogenous" RNA on the improvement of syngeneic tumor immunity, Cancer Res., 31 : 4 - 6, 1971.

84 - SARMA P.S., BARON S., Inhibitory effect of a synthetic interferon inducer on murine sarcoma and leukemia virus infection in vitro, Nature, 224 : 604-605,1969

85 - SCHMIDTKE J.R., JOHNSON A.G., Regulation of the immune system by synthetic polynucleotides, J. Immunology, 106 : 1191 - 1200, 1971.

86 - SCOTT O., Immunity against cancer, Nature, 223 : 1294, 1969.

87 - SHEPPARD J.R., Restoration of contact-inhibited growth to transformed cells by dibutyryl adenosine 3':5' cyclic monophosphate, Proc. Nat. Acad. Sci.U.S.A., 68 : 1316 - 1320, 1971.

88 - SJÖGREN H.O, Virology, 15 : 214 - 219, 1961.

89 - SJÖGREN H.L, Progr. Exp. Tumor Res., 6 : 289 - 322, 1965.

..../

90 - SMITH P.T., Tumor-specific immune mechanisms, New-England Med., 278:1207-1275, 1968.

91 - SOUTHAM C.M., MOORE G.E. and RHOADS C.P., Science, 125 : 158 - 160, 1957.

92 - SOUTHAN C.H., The immunologic status of patients with non lymphomatus cancer, Cancer Res., 28 : 1433 - 1440, 1968.

93 - STJERN SWÄRD J. and LEVIN A., Delayed hypersensitivity induced regression of human neoplasms, Cancer, 28 : 628 - 640, 1971.

94 - SVLITZEANU D., Agfinity of antigen for white cells and its relation to the induction of antibody formation, Bact. Rev., 32 : 401 - 424, 1968.

95 - SUTHERLAND R.M., PHA induced transformation of lymphocytes from patients with cancer, Cancer, 27 : 574 - 578, 1971.

96 - TING R.C. and LAW L.W., Progr. Exp. Tumorres., 9 : 165 - 191, 1967.

97 - TRITSH G.L, Variability of karyotypes and pigment-producing enzymes in a hamster melanoma, J. Nat. Cancer Inst., 40 : 877 - 890, 1968.

98 - WINCHURCH R., Antibody formation : premature initiation by endotoxin or synthetic polynucleotides in new-born mice, Nature, 223 : 843 - 844, 1969.

99 - WESTBURY G., Chemotherapy of malignant melanoma, Proc. Roy. Soc. Med., 63 : 88 - 89, 1970.

100 - WOODRUFF M.F.A and NOLAN B., Lancet, ii, 426 - 429, 1963.

101 - YOUN J.K., BARSKI G. et HUPPERT J., Inhibition de la leucémigènèse virale chez la souris par le traitement avec des polynucléotides synthétiques, C.R. Acad. Sci. Paris, 267 : 816, 1968.

102 - ZELEZNICK L.D, BHUYAN B.K., Treatment of leukemic mice with double-stranded polyribonucléotides, Proc. Soc. Exptl. Biol., 130 : 126, 1969.